

令和5年度希少感染症診断技術研修会
2024年2月15日

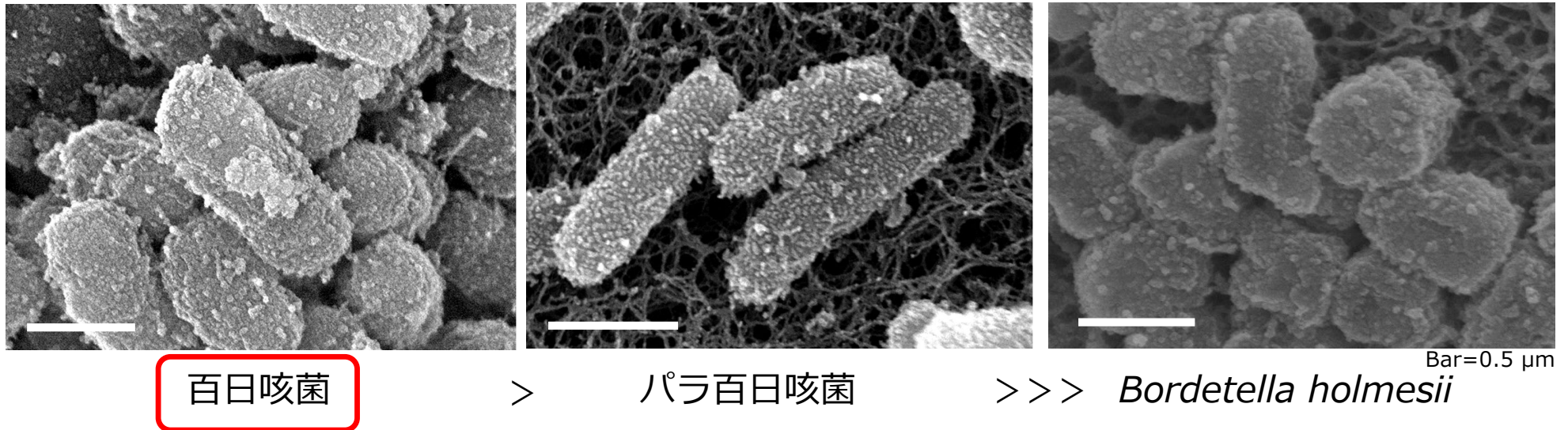


百日咳

国立感染症研究所・細菌第二部第一室
大塚菜緒

百日咳の基礎知識

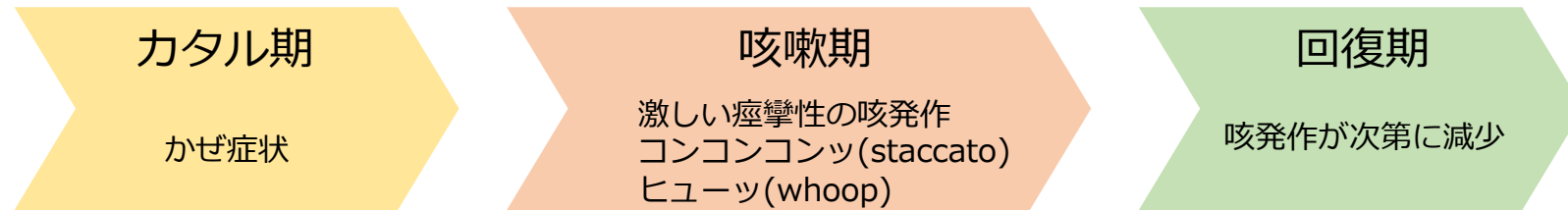
- 百日咳菌(*Bordetella pertussis*)によって引き起こされる急性呼吸器感染症



- 百日咳類縁菌もヒトに百日咳様症状を引き起こすが、臨床頻度が最も高いのは百日咳菌
- 感染症法では「百日咳菌による百日咳」だけが届出対象となっている
→検査診断では病原体の鑑別が必要

百日咳の基礎知識

- 主な症状は長期の咳（遷延性咳嗽）であり、乳幼児は重篤化し易い



- ワクチン予防可能疾患（VPDs）のひとつ

四種混合ワクチン（DPT-IPV）

五種混合ワクチン（DPT-IPV-Hib）
2024年4月から定期接種化

→日本では生後2, 3, 4ヶ月および1歳半頃に合計4回接種する

*ただし免疫持続期間は4~12年程度と推定されている



- 第一選択薬はマクロライド系抗菌薬（EM, CAM, AZM）

→近年アジア（特に中国）でマクロライド耐性百日咳菌が増加している

感染症法に基づく百日咳の届出

感染症法・五類感染症（全数把握対象）：百日咳との診断から7日以内に保健所への届出が必要

届出基準

- ア 患者（確定例）： 百日咳の臨床的特徴があり、検査所見により百日咳と診断した者
百日咳の臨床的特徴があり、検査所見がなくとも検査確定例と接触がある者
- イ 感染症死亡者の死体：百日咳の臨床的特徴があり、検査所見から百日咳により死亡したと判断した場合

届出のために必要な検査所見

検査方法	検査材料
分離・同定による病原体の検出	鼻腔、咽頭、気管支などから採取された検体
核酸増幅法による病原体の遺伝子の検出（PCR法・LAMP法・その他）	
イムノクロマト法による病原体の抗原の検出	鼻咽頭拭い液
抗体の検出（ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意な上昇、又は単一血清で抗体価の高値）	血清

[百日咳 感染症法に基づく医師届出ガイドライン（第二版）](#)

感染症法に基づく百日咳の届出

感染症法・五類感染症（全数把握対象）：百日咳との診断から7日以内に保健所への届出が必要

届出基準

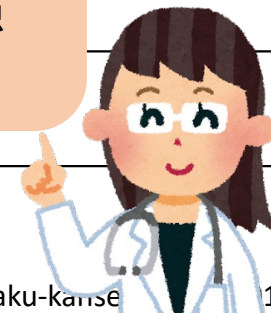
- ア 患者（確定例）： 百日咳の臨床的特徴があり、検査所見により百日咳と診断した者
百日咳の臨床的特徴があり、検査所見がなくとも検査確定例と接触がある者
- イ 感染症死亡者の死体：百日咳の臨床的特徴があり、検査所見から百日咳により死亡したと判断した場合

届出のために必要な検査所見

検査方法	検査材料
分離・同定による病原体の検出	
拡散増幅法による病原体の遺伝子の検出（PCR法・LAMP法・その他）	採取された検体
イムノクロマト法による病原体の抗原の検出	
抗体の検出（ペア血清による抗体陽転又は単一血清による抗体価の有意な上昇、又は単一血清で抗体価の高値を示す場合）	

届出における手順や検査結果の解釈については、[医師届出ガイドライン](#)を参照してください

[百日咳 感染症法に基づく医師届出ガイドライン（第二版）](#)



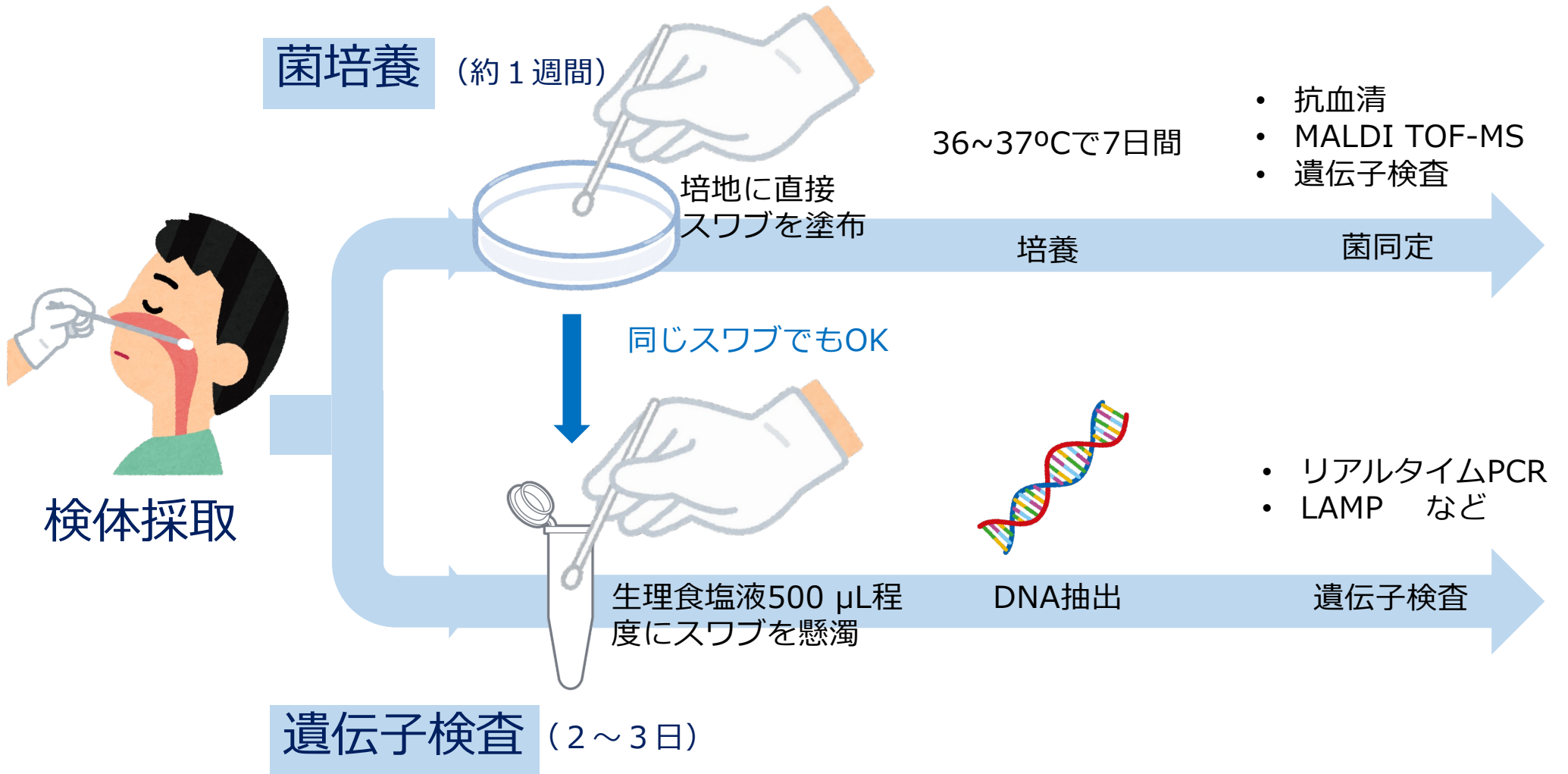
感染症法に基づく百日咳の届出

地方衛生研究所では、集団感染疑いの対応に備えて
菌培養と遺伝子検査が特に重要！

検査方法	検査材料
★ 分離・同定による病原体の検出	鼻腔、咽頭、気管支などから採取された検体
★ 核酸増幅法による病原体の遺伝子の検出（PCR法・LAMP法・その他）	
イムノクロマト法による病原体の抗原の検出	鼻咽頭拭い液
抗体の検出（ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意な上昇、又は単一血清で抗体価の高値）	血清

[百日咳 感染症法に基づく医師届出ガイドライン（第二版）](#)

百日咳検査の進め方



スワブ検体の採取と保存

■ 採取方法

滅菌スワブを患者の**後鼻腔**に静かに挿入して粘液を採取する
(乳児の場合は咽頭ぬぐい液でもOK)

スワブの材質に注意

OK	レーヨンスワブ ポリエステルスワブ (ダクロンスワブ)
NG	綿スワブ アルギン酸カルシウムスワブ

※スワブ付着菌が薄まらないよう、液体培地なしの輸送が良い

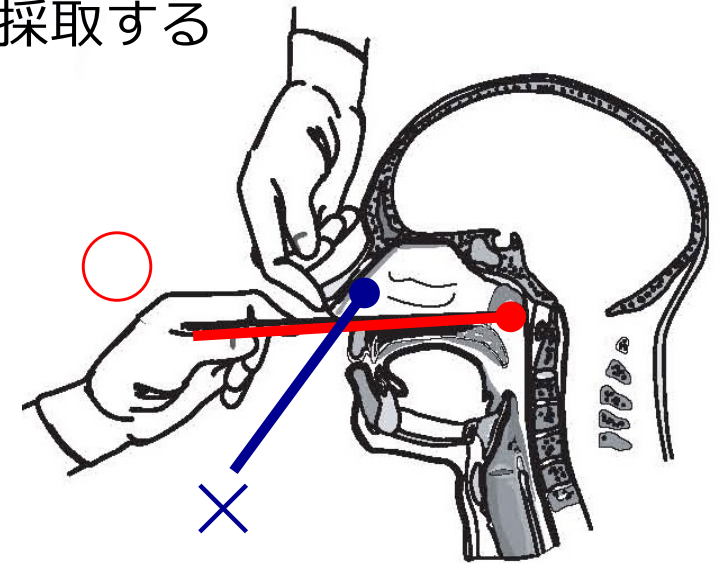


Image: Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases, 2015
(<https://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/specimen-collection-diagnosis.html>)

■ 輸送と保存

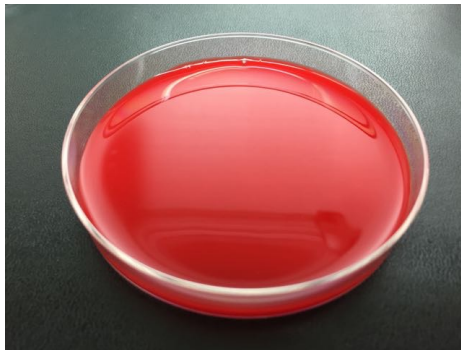
短期間 (1日程度) であれば**冷蔵**、数日かかる場合は雑菌の増殖を抑えるため**冷凍**

菌の分離・同定

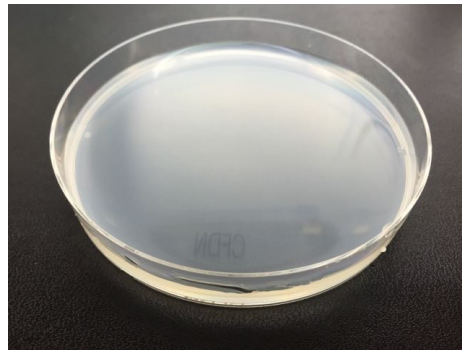
百日咳菌の菌分離は分離率が低いが意義が大きい

市販培地	販売	含有抗菌薬
Bordet-Gengou寒天培地 (BG培地)	極東製薬	-*
★ボルデテラCFDN寒天培地 (CFDN培地)	日研生物	4 µg/ml CFDN 8 µg/ml VCM

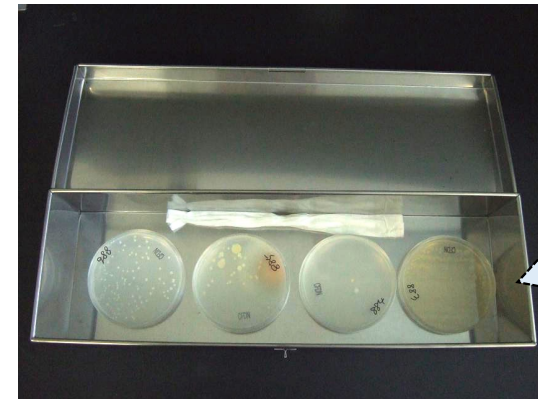
*自家調製する場合は40 µg/mLのセファレキシン(CEX)を加える



BG培地



CFDN 培地



コロニー形成に
4-5日かかる！

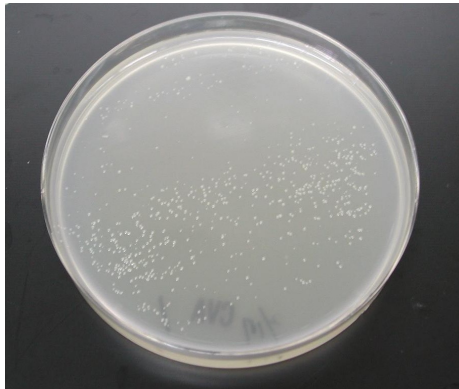
培養1-2日で生育
したものは、
百日咳菌ではな
いと考える良い

密閉容器に濡れたキムワイプを容器に入れるなど湿潤条件を保ち
36~37°Cで7日間培養する

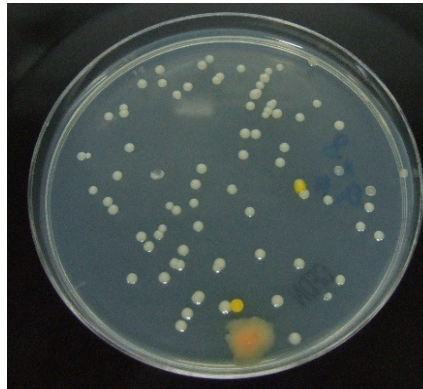
菌の分離・同定

● 培養検査の実施例（ボルデテラCFDN培地）

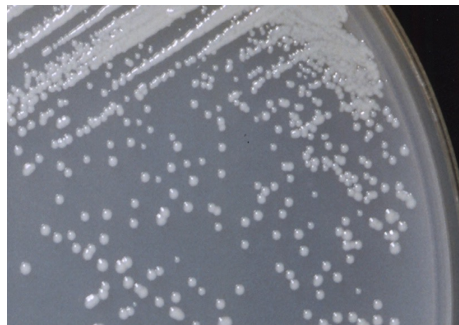
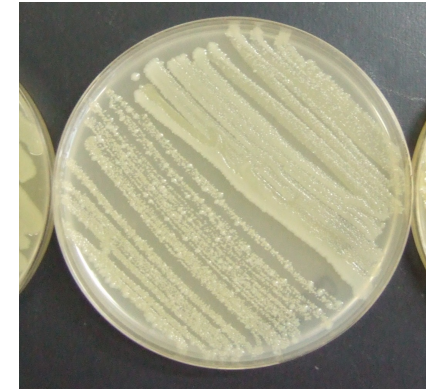
陽性例（純培養）



陽性例（典型的）



陰性例（雑菌多）



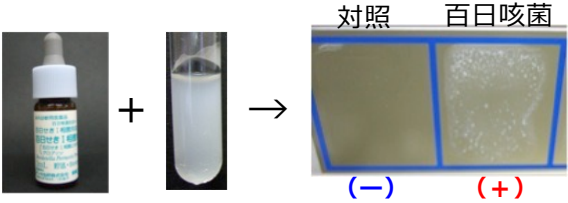


培養5日程度で直径1 mmほどの真珠様コロニーが認められる

注意

百日咳菌は培養陽性率が低い（<10%以下）ため、培養検査が陰性となっても百日咳感染を否定することはできない！

菌の分離・同定

■ 菌種の同定方法

精度	同定方法	試薬・機器と特徴
△	スライド凝集反応	<p>百日せきI相菌免疫血清「生研」(デンカ)</p>  <ul style="list-style-type: none"> • 操作が容易、迅速 • 必ずしも凝集反応が見られるわけではない • 自己凝集株に適用不可
○	MALDI TOF-MS	<p>Biotyper (Bruker)、VITEK MS (bioMerieux)</p>  <ul style="list-style-type: none"> • 操作が容易、迅速、低コスト • 稀に抗原欠損株で誤同定が発生する
◎	遺伝子検査	<p>リアルタイムPCR, LAMPなど</p>  <ul style="list-style-type: none"> • 特異性が高い • 稀にマイナーな類縁菌との鑑別が難しい場合がある <p>※16S rDNAシーケンスはBordetella属の類似性が高く鑑別が困難</p>

核酸増幅法

- 百日咳菌、パラ百日咳菌、*Bordetella holmesii*、肺炎マイコプラズマの4菌種を鑑別する

■ 4PlexリアルタイムPCR

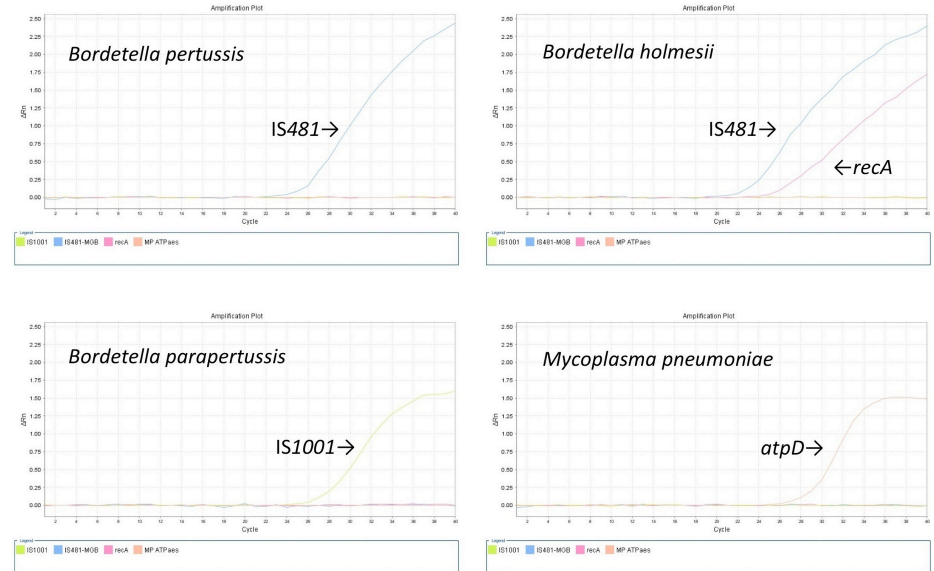
反応組成 (Applied Biosystems 7500Fastの場合 ver.3.2)

2×Premix Ex Taq (#RR039A, Takara)	10.0 μl
Mixed primers and probes	2.0 μl
テンプレートDNA	2.0 μl
50×ROX reference dye II	0.2 μl
DW	5.8 μl
Total	20.0 μl

PCR反応

Stage 1 (Reps: 1)	95°C, 15 sec
Stage 2 (Reps: 40)	95°C, 3 sec; 60°C, 30 sec

- ※リファレンスセンターにはキットを無償で配布しています
- ※Roche LightCycler用キットも配布予定



	IS481 (FAM)	recA (VIC)	IS1001 (NED)	atpD (Cy5)
百日咳菌	+	-	-	-
パラ百日咳菌	-	-	+	-
<i>B. holmesii</i>	+	+	-	-
<i>M. pneumoniae</i>	-	-	-	+

核酸増幅法

■ 百日咳LAMP法



栄研化学ホームページより引用
<https://loopamp.eiken.co.jp/product/loopamp-ivd/bp.html>

Loopamp 百日咳菌検出試薬キットD (栄研化学, #LMP542)

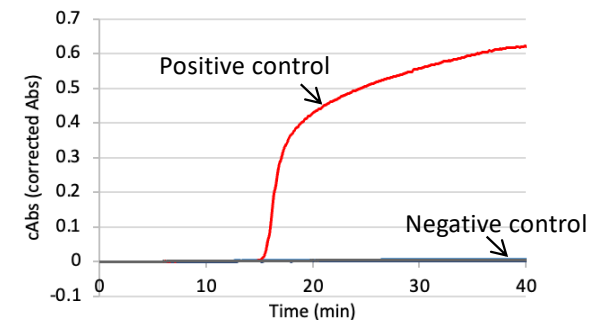
- 百日咳菌特異的な遺伝子配列(*ptxP*)をターゲットとする
- 最小検出感度：6.25コピー/アッセイ
- 対象検体：後鼻腔ぬぐい液*

*QIAamp DNA Micro Kit(QIAGEN)などで抽出したDNA溶液をサンプル溶液とする

<測定方法>

反応チューブ (CAP乾燥試薬)
プライマーミックス dBP: 15 μ l
サンプル溶液：10 μ l

反応：66°C, 40分間
測定：リアルタイム濁度測定装置



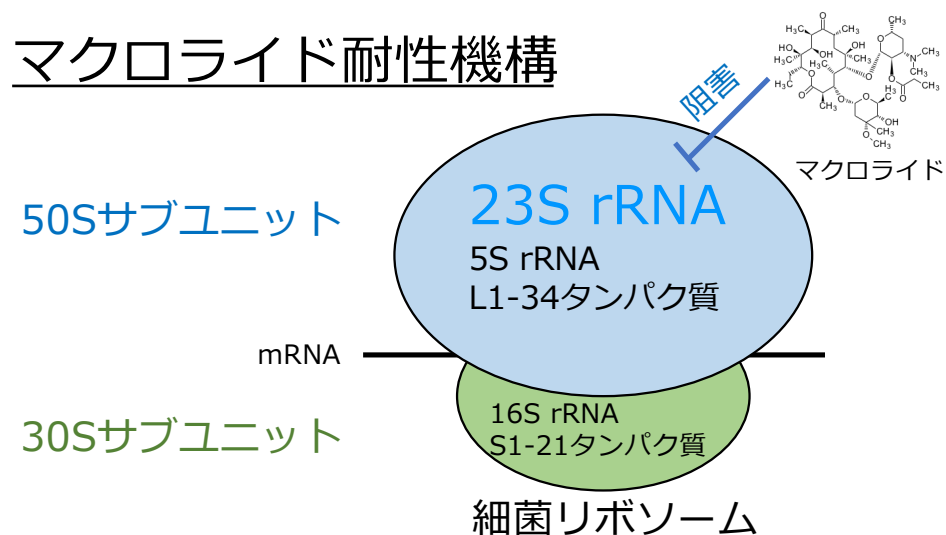
■ その他、百日咳診断に用いられている遺伝子検査法

- FilmArray (bioMérieux)：「呼吸器パネル2.1」で百日咳菌とパラ百日咳菌の識別検出が可能
- GENECUBE (極東製薬/東洋紡)：「ジーンキューブ百日咳」で百日咳菌とパラ百日咳菌の識別検出が可能 (QProbe法を利用)

マクロライド耐性百日咳菌

- 百日咳の第一選択薬であるマクロライド系抗菌薬に耐性を示す百日咳菌 (Macrolide-resistant *Bordetella pertussis*: MRBP と呼ばれる)
- 中国ではMRBPが蔓延しており、2013-2018年には分離株の88%がMRBPだった
- MRBPのアジア諸国への拡散が危惧されている
→既に日本 (大阪・東京)、台湾、ベトナム、カンボジアでMRBP検出報告あり)

マクロライド耐性機構



百日咳菌のマクロライド耐性はほぼコレ！

• 23S rRNA遺伝子の変異(A2047G)

※ゲノム解析では2037番目塩基の点変異

- 23S rRNAのメチル化(*erm*など)
- 排出ポンプ(*macAB-tolC*)
- マクロライド分解酵素(*ere*)
- マクロライド修飾酵素(*mph*など)

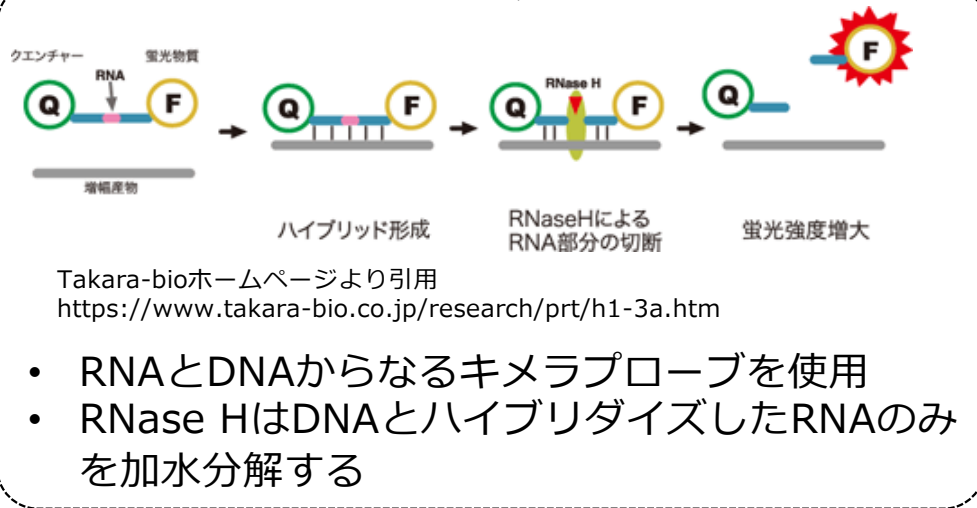
:

マクロライド耐性の検出

- 百日咳菌の23S rRNA遺伝子(A2047G)変異をリアルタイムPCRで検出する

■ A2047G-cycleave PCR法

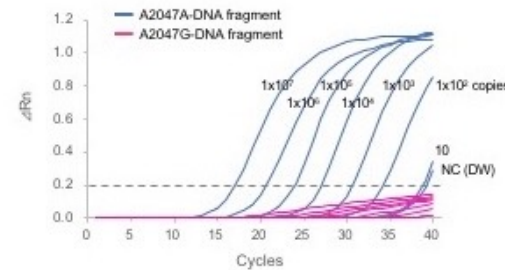
<サイクリングプローブ法>



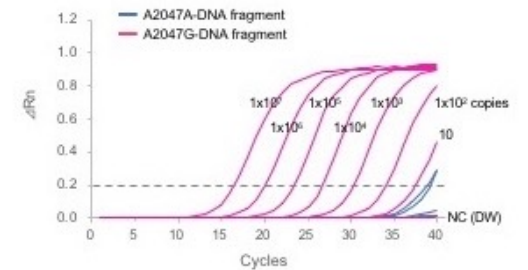
プローブ	配列	Quencher/Reporter
野生型検出プローブ	agacgg(A)aag*	5'-Eclipse/3'-FAM
変異型検出プローブ	gacgg(G)aag*	5'-Eclipse/3'-HEX

*括弧内の塩基はRNAを示す

野生型の検出



変異型の検出



蛍光増加	判定
FAM	マクロライド感受性(野生型 : A2047)
HEX	マクロライド耐性(変異型 : A2047G)
FAM+HEX	ヘテロ型(A2047+A2047G)

※地衛研には無償で検査キットを配布しています

Kamachi K, Duong HT, Dang AD, Hai T, Do D, Koide K, et al. Macrolide-resistant *Bordetella pertussis*, Vietnam, 2016 to 2017. *Emerg Infect Dis.* 2020;**26**:2511–2513.

まとめ



- 百日咳は乳幼児、特に生後6ヶ月未満は重篤化しやすい
- ワクチン免疫の減弱により、小学校高学年以降は百日咳菌に感染する
- 百日咳菌の菌分離率は低い
→散発例では遺伝子検査(リアルタイムPCR、LAMPなど)を活用する
- 集団感染疑い事例では、遺伝子検査による迅速診断が有用
菌分離もされれば確定的！
- 百日咳菌のマクロライド耐性に要注意
→分離株でも臨床検体でも、23S rRNA遺伝子のA2047G変異を確認する

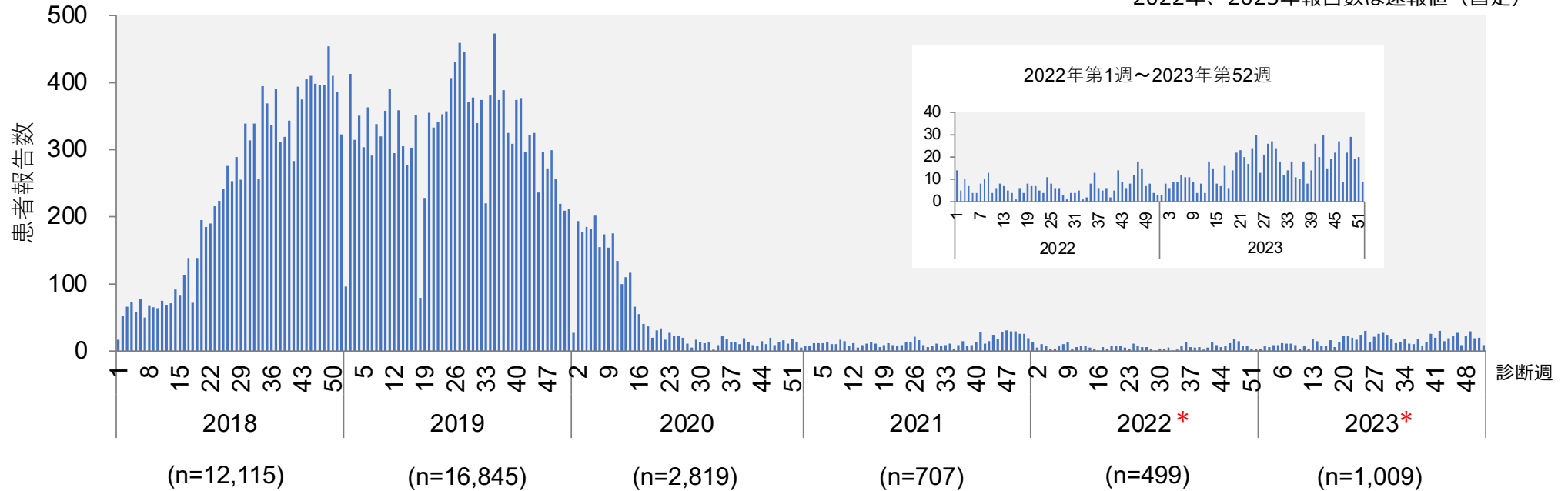
百日咳検査の詳細は感染研ホームページ > 「病原体検出マニュアル 百日咳」をご参照ください

参考情報

国内百日咳の発生状況

2018年第1週～2023年第52週

*2022年、2023年報告数は速報値（暫定）



- 新型コロナウイルス感染症流行の影響で2020年以降報告数が激減している
 → 今後は人流の再開とともに患者増加が懸念される
 外国人旅行客からの持ち込みにも要注意